利用 GAP 启动子在毕赤酵母中组成型表达人鹅型溶菌酶 2*

黄 鹏[1#**]　闫丽萍[2#]　张宁[3]　石金磊[4]

（1 上海健康医学院临床医学院 上海 201318）

（2 青岛大学附属中心医院检验科 青岛 266042）

（3 上海健康医学院基础医学院 上海 201318）

（4 上海科技大学生命科学与技术学院 上海 201210）

摘要　利用甘油醛三磷酸脱氢酶（glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase，GAP）启动子在毕赤酵母中表达人鹅型溶菌酶 2（human goose-type lysozyme 2，hLysG2），并在小试规模建立一套有效的重组 hLysG2（recombinant hLysG2，rhLysG2）生产工艺流程。根据毕赤酵母密码子偏爱性设计并人工合成 *hLysG2* 基因，将其连接至 pGAPZαA 质粒中，构建重组表达质粒 pGAPZαA-*hLysG2*。将重组表达载体线性化后电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞，通过 Zeocin 抗性筛选获取高拷贝重组菌株，并在 5L 生物反应器中进行发酵培养。发酵 60 h 后发酵液上清酶活性达到最高，发酵液上清经 SDS-PAGE 及 Western blot 检测证实 rhLysG2 得到表达。与诱导型表达相比，组成型表达发酵时间缩短了 48 h，上清中 rhLysG2 总活性提高了 23.8%；使用甲壳素亲和层析和分子筛层析对 rhLysG2 进行纯化后，每升发酵液上清可纯化到 187.4 mg 重组蛋白，纯化产物纯度达 99.0%以上；浊度测定法分析显示，在 pH 5.6、30 ℃和 0.1 mol/L Na^+的条件下，rhLysG2 可达到最大酶活性 13500 U/mg。利用 GAP 启动子在毕赤酵母中成功表达了高纯度和高活性的 rhLysG2，避免了甲醇的使用，缩短了发酵时间，提高了蛋白产量，为将 rhLysG2 开发为新型抗耐药菌药物奠定了基础。

关键词　人鹅型溶菌酶 2　毕赤酵母　GAP 启动子　组成型表达　杀菌活性

中图分类号　R392-33，R392.11 [1]

基金资助: *上海市卫生计生委科研课题(201740161); 上海市自然科学基金(15ZR1421800)
#并列第一作者: 黄鹏, 闫丽萍; **通讯作者: 黄鹏, E-mail: huangp_15@sumhs.edu.cn

Constitutive Expression of Human Goose-type Lysozyme 2 in *Pichia pastoris* Using the GAP Promoter

HUANG Peng[1] YAN Li-ping[2] ZHANG Ning[3] SHI Jin-lei[4]

(1 College of Clinical Medicine, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

(2 Clinical Laboratory, Affiliated Central Hospital of Qingdao University, Qingdao 266042, China)

(3 College of Basic Medicine, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

(4 School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China)

Abstract In this study, we aimed to achieve the constitutive expression of human goose-type lysozyme 2 (hLysG2) in *Pichia pastoris* using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP) promoter and to establish an efficient strategy for the production of recombinant hLysG2 (rhLysG2) on a bench scale. The *hLysG2* gene was synthesized according to the codon usage preference of *P. pastoris* and cloned into pGAPZαA vector. The resulting pGAPZαA-*hLysG2* plasmid was linearized and transformed into competent *P. pastoris* GS115, followed by Geneticin screening. The transformants with higher Geneticin resistance were selected to investigate the constitutive expression of rhLysG2 in *P. pastoris*. The lytic activity of rhLysG2 in the fermentation broth reached its peak after 60 h of cultivation. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that rhLysG2 was successfully secreted into the fermentation broth. There were a 23.8% increase in the total lytic activity and a 48 h reduction in the cultivation time in comparison with those of the *P. pastoris* strain integrated with the pPIC9K-*hLysG2* plasmid. Using chitin

affinity and size-exclusion chromatography, rhLysG2 was purified with a yield of 187.4 mg/L of fermentation supernatant, above 99.9% purity and a specific activity of 13500 U/mg under the condition of pH 5.6, 0.1 mol/L of Na^+, 30 ℃. In conclusion, rhLysG2 was expressed at high level in *P. pastoris* by codon optimization and had *in vitro* bactericidal activity against some pathogenic bacteria, which has laid a solid foundation for its possible future pharmaceutical applications.

Key words Human goose-type lysozyme 2 *Pichia Pastoris* GAP promoter Constitutive expression Bactericidal activity

溶菌酶是是一种广泛存在于自然界各种生物体内的水解酶，在动物、植物、真菌、细菌和噬菌体中均有发现。根据氨基酸组成、分子结构和酶学特性，溶菌酶可分为 6 种类型：鸡型（chicken type，C-type）、鹅型（goose type，G-type）、无脊椎动物型（invertebrate type，I-type）、以及噬菌体溶菌酶、细菌溶菌酶、植物溶菌酶[1-2]。先天性免疫系统通常被认为是保护生物体不被病原微生物侵袭的第一条防线，很多研究已经表明各种类型的溶菌酶（如 C 型和 G 型溶菌酶）是生物体内最重要的先天性免疫防御因子，它们可以水解细菌细胞壁肽聚糖的 N-乙酰胞壁酸 C-1 与 N-乙酰氨基葡萄糖 C-4 之间的糖苷键，破坏肽聚糖骨架，使细菌在内部渗透压的作用下破裂死亡，从而发挥保护功能[3]。

G 型溶菌酶最初于 1967 年在埃姆登鹅的蛋清中发现，被认为是一种具有杀菌功能的酶[4]。随后，在多种脊椎动物（如哺乳动物、鸟类、鱼类）及无脊椎动物（如软体动物）中均克隆到了 G 型溶菌酶基因 [5-11]。如大菱鲆体内存在两种 G 型溶菌酶，其被细菌感染后，黏膜组织中 G 型溶菌酶 2 的表达水平上调，发挥杀菌作用[7]。人体内分布有两种 G 型溶菌酶，人 G 型溶菌酶 1 和人 G 型溶菌酶 2（human goose-type lysozyme 2，hLysG2），目前发现仅有 hLysG2 保留了与杀菌活性相关的底物结合位点和活性中心的关键催化残基[1, 12-13]。本课题组的前期研究表明 hLysG2 在眼部组织和男性生殖系统中表达，可被分泌到泪液和精浆中

发挥杀菌作用[12, 14-15]。

近些年来，各种超级耐药细菌的出现及迅速传播使得感染性疾病的治疗矛盾显得十分突出，寻找与传统抗生素作用机制不同的新型抗菌药物已成为当下最迫切任务[16-17]。由于溶菌酶的杀菌机制与抗生素不同，致病菌无法对其产生耐药性；另外，hLysG2 和人 C 型溶菌酶是由不同的基因编码，两者的酶学活性并不相同，因此 hLysG2 具有独特的应用前景，是新型抗耐药菌药物的候选分子之一。为了建立一套高效表达 hLysG2 的生产工艺，本课题组采用毕赤酵母作为表达系统，这一系统具有如外源基因遗传稳定、蛋白可翻译后加工、产物可被适当糖基化、产物可分泌、可高密度发酵等诸多优点[18-22]。不过除了表达系统本身的优势之外，外显子种类的选择也是一个影响蛋白表达及生产工艺的重要因素。1997 年, Waterham/等首次分离了甘油醛三磷酸脱氢酶（glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase，GAP）启动子[23]。与利用醇氧化酶 1（alcohol oxidase 1，*AOX1*）启动子的诱导型表达相比，利用 GAP 启动子的组成型表达不需要把碳源从甘油更换到甲醇，而且相对于诱导型表达系统缩短了发酵周期，提高了生产率，因此更适合大规模生产外源蛋白[24-26]。

本研究拟根据毕赤酵母密码子偏爱性设计并人工合成 *hLysG2* 基因，利用 GAP 启动子在毕赤酵母中高效表达 rhLysG2，并在小试规模建立一套有效的 rhLysG2 生产工艺流程，从而为 rhLysG2 的应用研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　菌种与质粒　金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）、粪肠球菌（*E. faecalis*）、沙门氏菌（*S. bacteria*）、多杀性巴氏杆菌（*P. multocida*）、和无乳链球菌（*S. agalactiae*）购自武汉大学菌种保藏中心；毕赤酵母GS115菌株、大肠杆菌TOP10F′菌株、溶壁微球菌（*M. lysodeikticus*）、由本室保存，酵母组成型表达载体pGAPZαA购自Invitrogen公司。

1.1.2 试剂 质粒小量提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自Qiagen公司，核酸和蛋白分子量标准、Pyrobest DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性核酸内切酶*EcoR* I、*Not* I和*Avr* II 购自NEB公司；*hLysG2*基因及所有引物由Sangon Biotech公司合成；酵母氮源培养基（Yeast Nitrogen Base，YNB）；Zeocin购自Invitrogen公司；兔抗hLysG2多克隆抗体、甲壳素亲和层析介质由本研究室制备并保存；ECL检测试剂盒购自Santa Cruz Biotechnology公司；Amicon® Ultra超滤管购自Millipore公司。

1.1.3 培养基 LB培养基：1%酵母提取物，2%胰蛋白胨，1%NaCl。YPD培养基：1%酵母提取物，2%胰蛋白胨，2%葡萄糖。YPDS固体培养基：1%酵母提取物，2%胰蛋白胨，2%葡萄糖，1 mol/L山梨醇，2%琼脂粉。发酵培养基：1%酵母提取物，2%胰蛋白胨，2%葡萄糖，0.5%KH_2PO_4、0.05%MgSO4·7H_2O，调节pH6.0。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因合成 根据hLysG2的cDNA序列（GenBank：NM_175735）和毕赤酵母密码子偏爱性设计并合成hLysG2编码序列，在5′端引入*EcoR* I酶切位点，在3′端引入*Sal* I酶切位点，基因合成后连接入pMD18-T载体构建重组质粒pMD18-T-*hLysG2*。

1.2.2 重组质粒构建 将pMD18-T-*hLysG2*转化大肠杆菌TOP10F′，扩增培养后提取重组质粒。使用*EcoR* I和*Not* I双酶切pMD18-T-*hLysG2*质粒，回收目的片段后连接入经同样双酶切的pGAPZαA载体构建pGAPZαA-*hLysG2* （图1）。将pGAPZαA-*hLysG2*转化大肠杆菌TOP10F′感受态细胞，并涂布LB琼脂平板（含25 μg/mL的Zeocin），最后挑取单个阳性菌落接种于LB液体培养基培养，提取重组质粒后使用pGAP Forward引物和3′-*AOX1*引物扩增（表1），并进行双酶切鉴定。

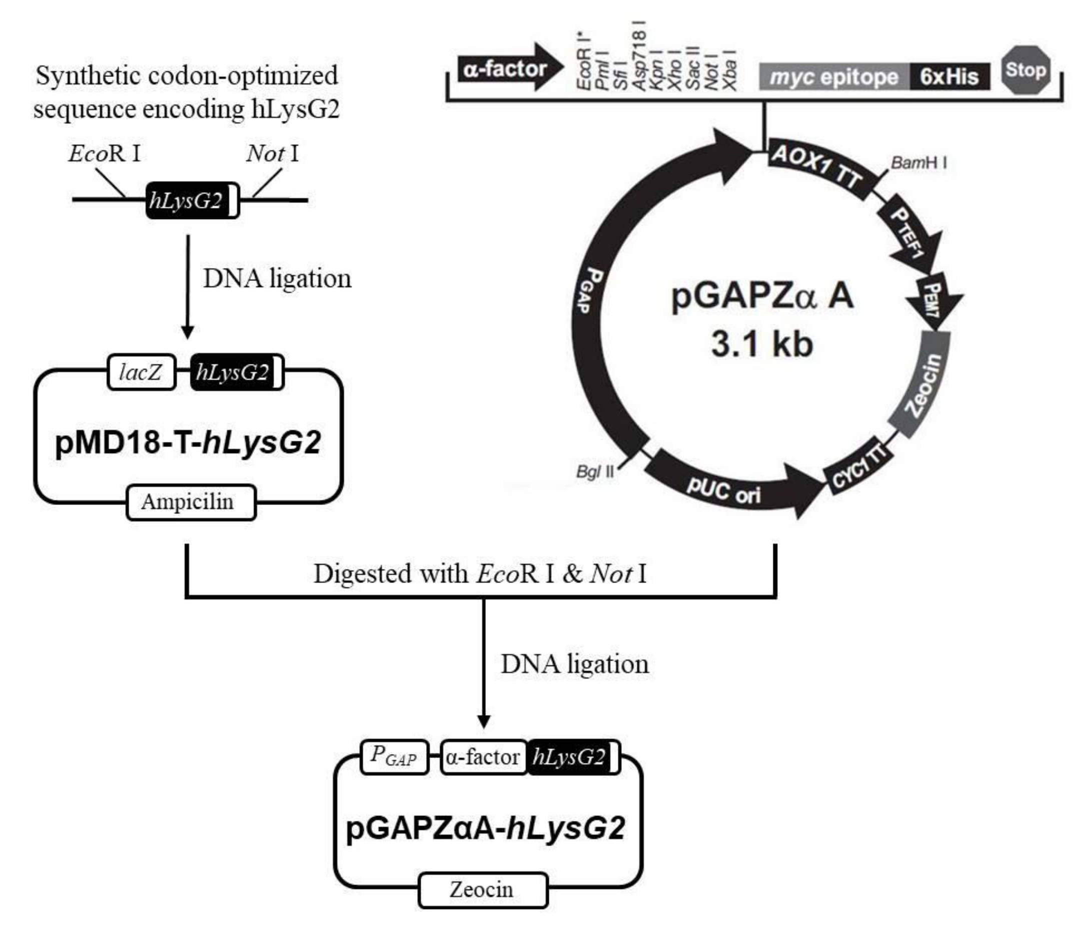


图 1　目的基因扩增及重组质粒酶切鉴定

Fig. 1　Identification of recombinant expression plasmid

表1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

Name	Primer sequence (5′-3′)
pGAP Forward	GTCCCTATTTCAATCAATTGAA
3′-*AOX1*	GCAAATGGCATTCTGACATCC
hLysG2 Forward	TCTTACCCATTTAGTCATTC
hLysG2 Reverse	TTAGAAGCTTTGTCTTTTAT

1.2.3　菌株转化与筛选　使用 *Avr* II 对 pGAPZαA-*hLysG2* 进行线性化处理后，通过电转化法（电压 1500 V，电容 25 μF，电阻 200 Ω）转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。向电转杯中

加入等体积已预冷的 1 mol/L 无菌山梨醇溶液，混匀后涂布 YPDS 固体培养基（含 100 μg/mL 的 Zeocin），置于 30 ℃培养 2～3 d。待菌落长出后挑取阳性克隆株接种 YPDS 平板（分别含 500，1000，2000 μg/mL 的 Zeocin）继续培养 2～3 d 进行高拷贝菌株筛选。通过蜗牛酶法提取重组子染色体基因组，使用 *hLysG2* Forward 引物和 *hLysG2* Reverse 引物扩增目的基因进行确认。

1.2.4　诱导表达　将筛选出的重组毕赤酵母菌株 GS115-pGAPZαA-*hLysG2* 接种 25 mL 的 YPD 培养基，30 ℃摇床培养 36 h 作为种子培养基。将种子培养基以 1%接种量转接至含有 2.5 L YPD 培养基的 5 L 发酵罐中，30 ℃酵培养 5 d，每 24 h 补加甘油至终浓度 1%。以本实验室之前使用诱导型表达载体 pPIC9K 构建的重组毕赤酵母菌株 GS115-pPIC9K-*hLysG2* 作为对照[12, 27]，实验重复三次。

1.2.5　重组蛋白纯化　根据本研究室已报道的方法进行甲壳素亲和纯化[27]，将发酵液离心（3000× *g*，30 min），收集上清。取 20 mL 甲壳素亲和层析介质与 500 mL 上清混合，室温搅拌吸附 10 min，沉淀 5 min 后倾去上清，将甲壳素亲和层析介质装填色谱柱，用 pH 6.4 的 0.02 M PBS 灌流柱床至流出液 A_{280nm} 至基线，换用 0.01 mol/L 醋酸溶液洗脱，收集洗脱峰。用 0.5 mol/L 碳酸盐缓冲液调节洗脱液的 pH 至 7.0 后装入的透析袋（截留范围 *Mr* 4000～6000），4 ℃对 PBS 透析过夜后超滤浓缩。将 Sephadex G-75 充分溶胀后装填层析柱，PBS 平衡。将超滤后的酶液上柱，收集独立洗脱峰，超滤浓缩后进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6　HPLC 分析　样品为 5 μg/mL 的 rhLysG2 溶液，上样体积 35 μL。采用 Agilent series 1100 型 HPLC 分析仪，C18 反相层析柱。溶液 A：1 mL/L 三氟乙酸水溶液，溶液 B：0.85 mL/L 三氟乙酸乙腈溶液，洗脱梯度为 0～80%乙腈溶液，洗脱时间 45 min，洗脱温度 25℃。

1.2.7　酶学性质测定　使用醋酸盐缓冲液和 PBS 分别配制 pH 范围为 4.0～5.6 和 6.0～8.4 的溶壁微球菌底物溶液（A_{450nm} 为 0.8 左右）测定 rhLysG2 的最适 pH 值；配制 NaCl 浓度为

0.025 mol/L～0.2 mol/L 的底物溶液测定 Na^+离子浓度对酶活性的影响；将底物溶液分别置于 4 ℃～80 ℃水浴，保持温度恒定，观察温度对酶活性的影响；将酶液分别置于 30 ℃～80 ℃水浴 30 min，观察温度对蛋白稳定性的影响。配制分别含有 Na^+、Co^+、Ca^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Hg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+} 7 种离子的底物溶液，测定离子种类对酶活性的影响。取 50 μg/mL 的 rhLysG2 工作溶液 10 μL 与 250 μL 底物溶液混合，室温反应 1 min，计算 A_{450} 下降值，以测得的最大值为参照，分别绘制 pH-相对活性曲线、盐浓度-相对活性曲线、温度-相对活性曲线和热稳定性曲线，以上实验均重复三次。在最适反应条件下，测定 rhLysG2 的标准酶活性。酶活性单位（U/mg）的定义为 A_{450nm} 每分钟下降 0.001 为一个酶活力单位。

1.2.8　杀菌活性检测　采用克隆形成单位法分析 rhLysG2 的杀菌活性。使用金黄色葡萄球菌和粪肠球菌两株 Gram 阳性细菌，以及沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、无乳链球菌三株 Gram 阴性细菌作为供测菌。从细菌保种平板上挑取被测菌株克隆接种 2 mL LB 液体培养基，37℃摇床震荡培养过夜。取 0.5 mL 培养液再次接种 25 mL LB 液体培养基，37 ℃继续摇床震荡培养至对数中期，离心收集菌体（3000× *g*，10 min），PBS 洗两次后重悬于含有 0.1 mmol/L NaCl 的 10 g/L 蛋白胨培养基（pH6.0），最终菌体密度为 2×10^5 个/mL。将 0.1 mL 的 rhLysG2 溶液（50 μg/mL）与等体积被测菌溶液混合，37 ℃孵育 2 h 后，取 0.1 mL 涂布 LB 固体琼脂培养基，置于 37 ℃培养至菌体克隆出现。使用 PBS 作为阴性对照，实验重复三次。

1.2.9 统计学分析　杀菌活性检测所得数据用 SPSS 17.0 统计软件分析。组间比较采用配对样本 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　重组质粒构建

使用 pGAP Forward 引物和 3′-*AOX1* 引物扩增重组质粒 pGAPZαA-*hLysG2*，结果显示在约 1081 bp 处出现特异条带，与预期的包含酿酒酵母α-因子信号肽序列和 hLysG2 编码基因

的扩增片段长度相符；重组质粒 pGAPZαA-*hLysG2* 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳，结果显示酶切产物在约 589 bp 处出现特异条带，与预期 hLysG2 编码基因长度相符（图 2）。

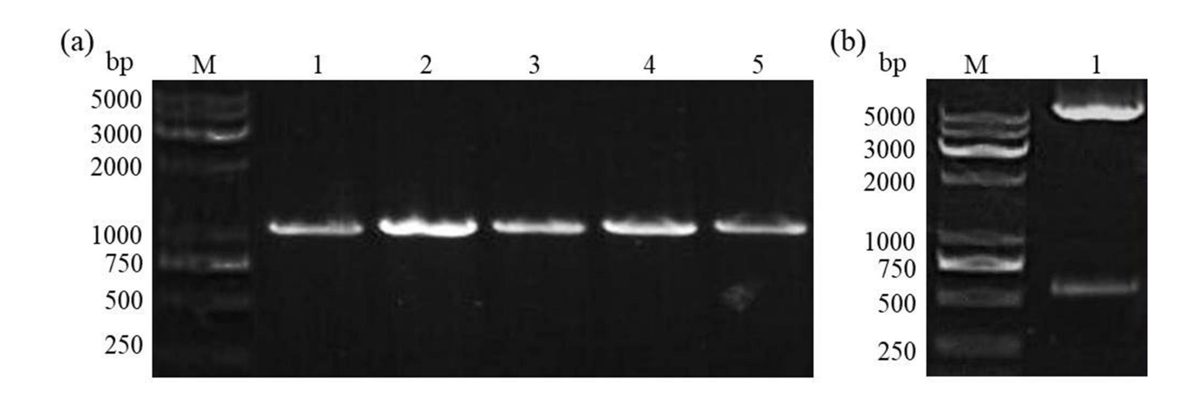


图 2　目的基因扩增及重组质粒酶切鉴定

Fig. 2　Identification of recombinant expression plasmid

(a) Lane M: DNA Marker; Lanes 1−5: amplification products; (b) Lane M: DNA Marker; Lane 1: the pGAPZαA-*hLysG2* plasmid digested by *Eco*R I and *Not* I

2.3 重组毕赤酵母菌株转化与筛选

经 YPDS 抗性平板筛选后得到 28 个阳性克隆，挑取菌落抽提其 DNA，以 *hLysG2* Forward 引物和 *hLysG2* Reverse 进行 PCR 鉴定，约有 80%的克隆扩增到约 582 bp 的片段，与预期大小相符，表明 *hLysG2* 基因已整合入毕赤酵母基因组（图 3）。

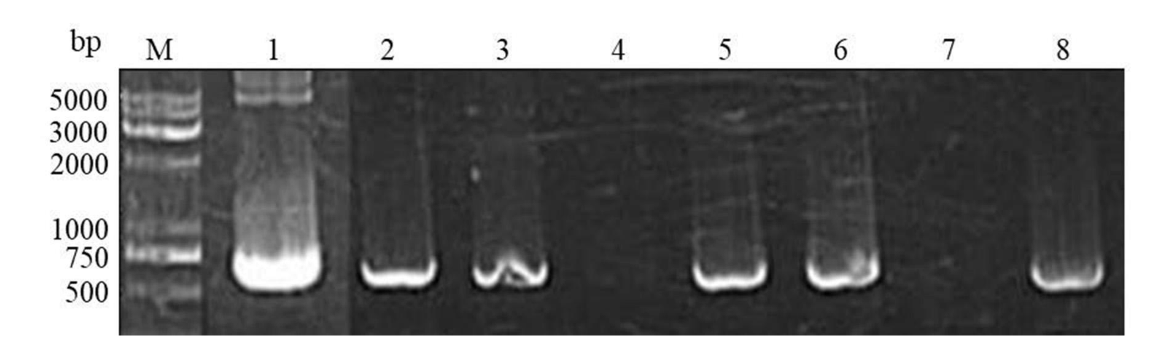


图 3　阳性重组毕赤酵母菌株 PCR 鉴定

Fig. 3　Identification of positive transformants by PCR

Lane M: DNA Marker; Lane 1: pGAPZαA-*hLysG2*; Lanes 2−3, 5−6 and 8: positive transformants; Lanes 4 and 7: negative clones

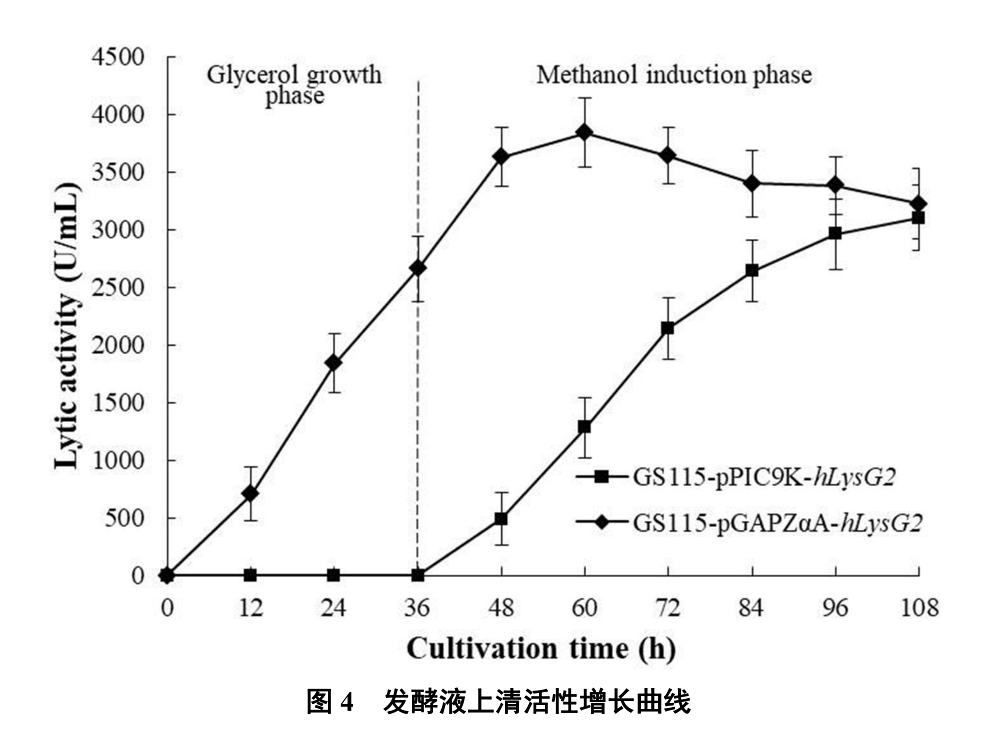


图 4　发酵液上清活性增长曲线

Fig. 4　Increment curve of lytic activity in the fermentation supernatant

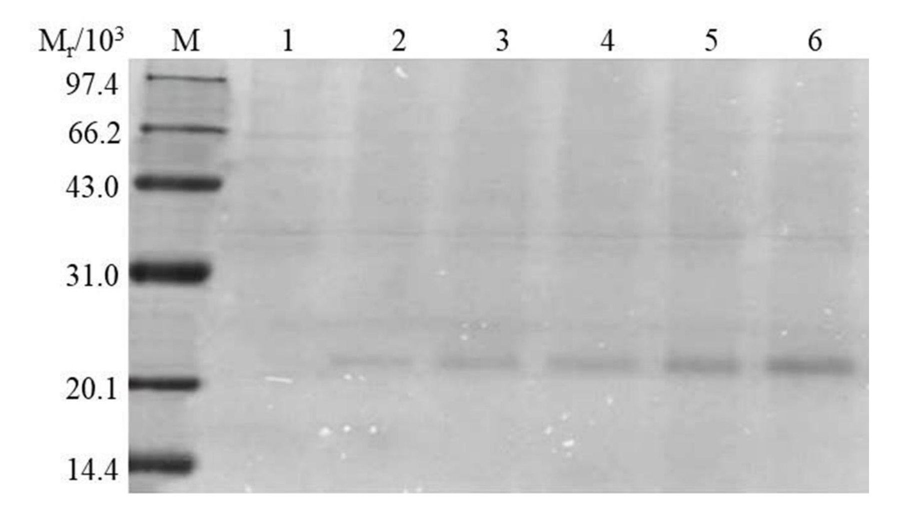


图 5　发酵液上清的 SDS-PAGE

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of the fermentation supernatant

Lane M: molecular weight marker; Lanes 1−6: 10 μL of the fermentation supernatant taken at 0,

12, 24, 36, 48 and 60 h

2.4　重组蛋白诱导表达

发酵结束后对发酵液上清进行活性检测，结果表明发酵时间的增加，单位发酵液上清中酶活性也逐渐增加，酶活性在约 60 h 左右达到最高。与诱导型表达相比，组成型表达发酵时间缩短了 48 h，上清中 rhLysG2 总活性提高了 23.8%(图 4)；对发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析，目的蛋白在 21.5 kDa 处表达，与 rhLysG2 预期大小一致，使用兔抗 hLysG2 多克隆抗体也可检测到此条带，初步表明 rhLysG2 在组成型毕赤酵母表达系统中获得有效表达(图 5)。

2.5　重组蛋白纯化

使用甲壳素亲和层析对发酵液上清中的 rhLysG2 进行纯化，在洗脱曲线上均出现单一洗脱峰（图 6）；SDS-PAGE 可在 21.5 kDa 处检测到目的蛋白，使用 Western blot 法也可检测到此条带（图 7）；HPLC 分析显示纯化到的 rhLysG2 纯度大于 99.0%（图 8）；上清液酶活性回收率可达到 42.74%（表 2）。

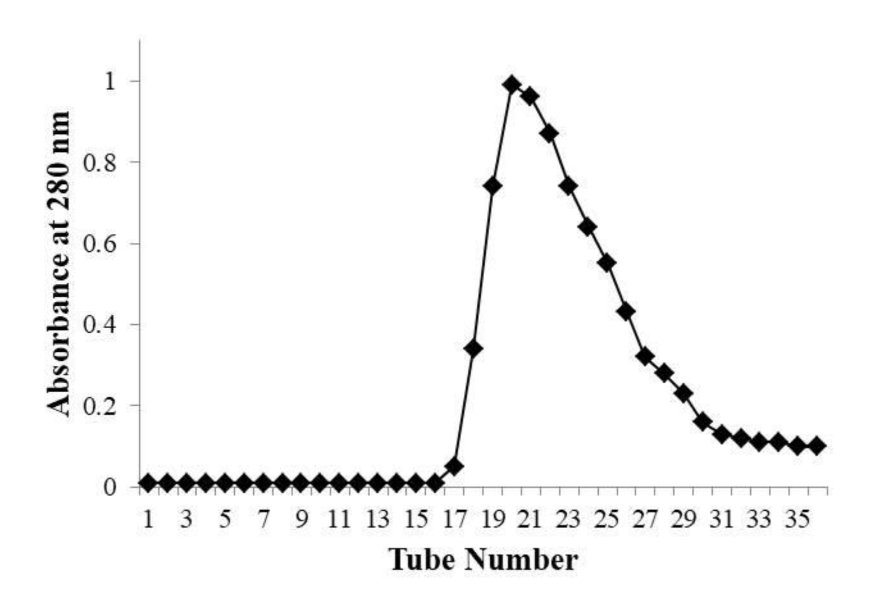


图 6　甲壳素亲和层析洗脱曲线

Fig. 6　Elution profile of chitin affinity chromatography

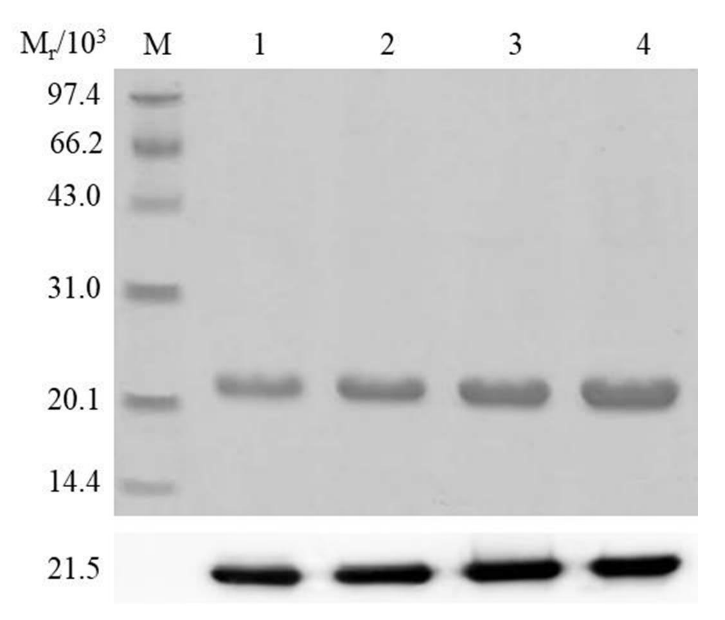


图 7　rhLysG2 纯化蛋白 SDS-PAGE (上) 与 Western blot 分析 (下)

Fig. 7　SDS-PAGE (upper) and Western blot analysis (bottom) of purified rhLysG2

Lane M: Molecular weight marker; Lanes 1−4: purified rhLysG2

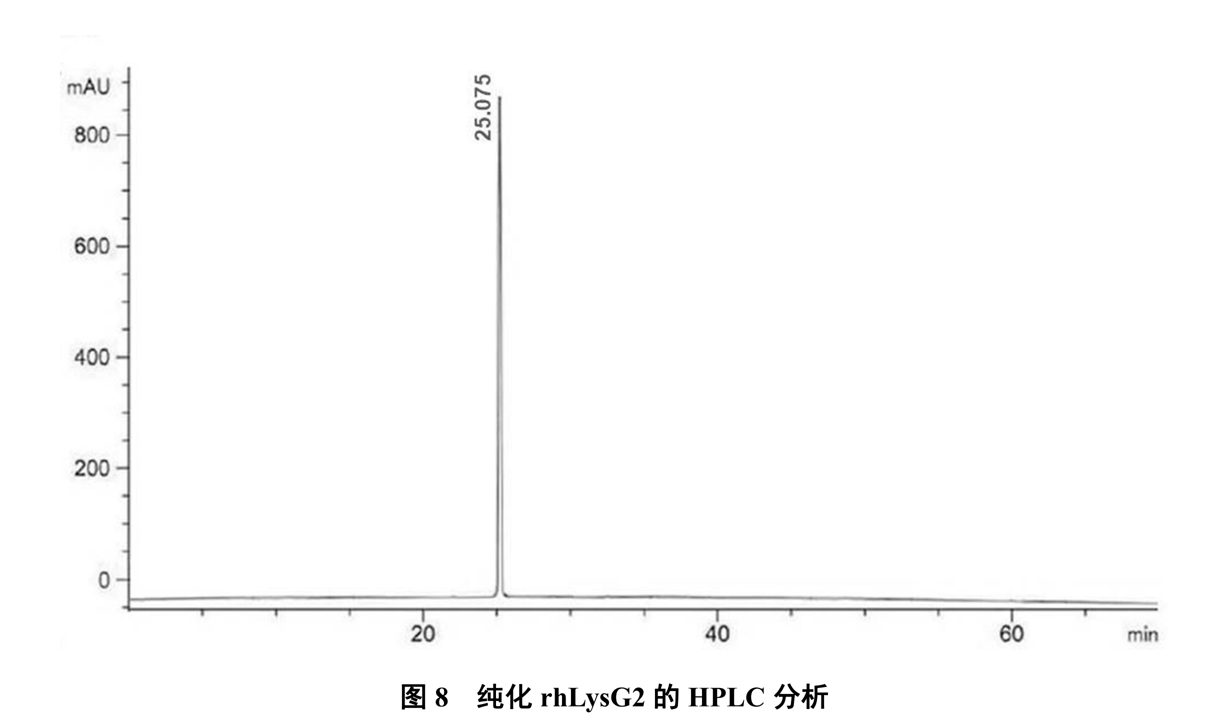


图 8　纯化 rhLysG2 的 HPLC 分析

Fig. 8　HPLC analysis of purified rhLysG2

表 2　rhLysG2 纯化过程收率分析

Table 2　Results of the purification of rhLysG2

Step	Total protein (mg/L)	Total lytic activity (× 10^6 U/L)	Activity recovery (%)
Supernatant	428 ± 21	3.84 ± 0.28	100.00
After chitin affinity chromatography	301 ± 18	2.70 ± 0.23	70.25
After size-exclusion chromatography	199 ± 17	1.78 ± 0.20	46.38
After centrifugal filtration	184 ± 15	1.64 ± 0.18	42.74

2.6　酶活性分析

rhLysG2 的最适反应 pH 为 5.6 左右（图 9a）；离子浓度也能较为显著的影响其活性，在 0.1 mol/L 的 Na^+浓度下，rhLysG2 活性最高（图 9b）； rHLysG2 的最适温度在 30 ℃左右（图 9c）；rHLysG2 也显示了较高的热稳定性，80 ℃处理 30 min 后仍可保留接近 80%的酶活性（图 9d）；Co^+、Cu^{2+}、Zn^{2+}等 8 种离子对 rhLysG2 活性均有影响，其中，Cu^{2+}的影响最为显著，使其活性完全丧失（表 3）.

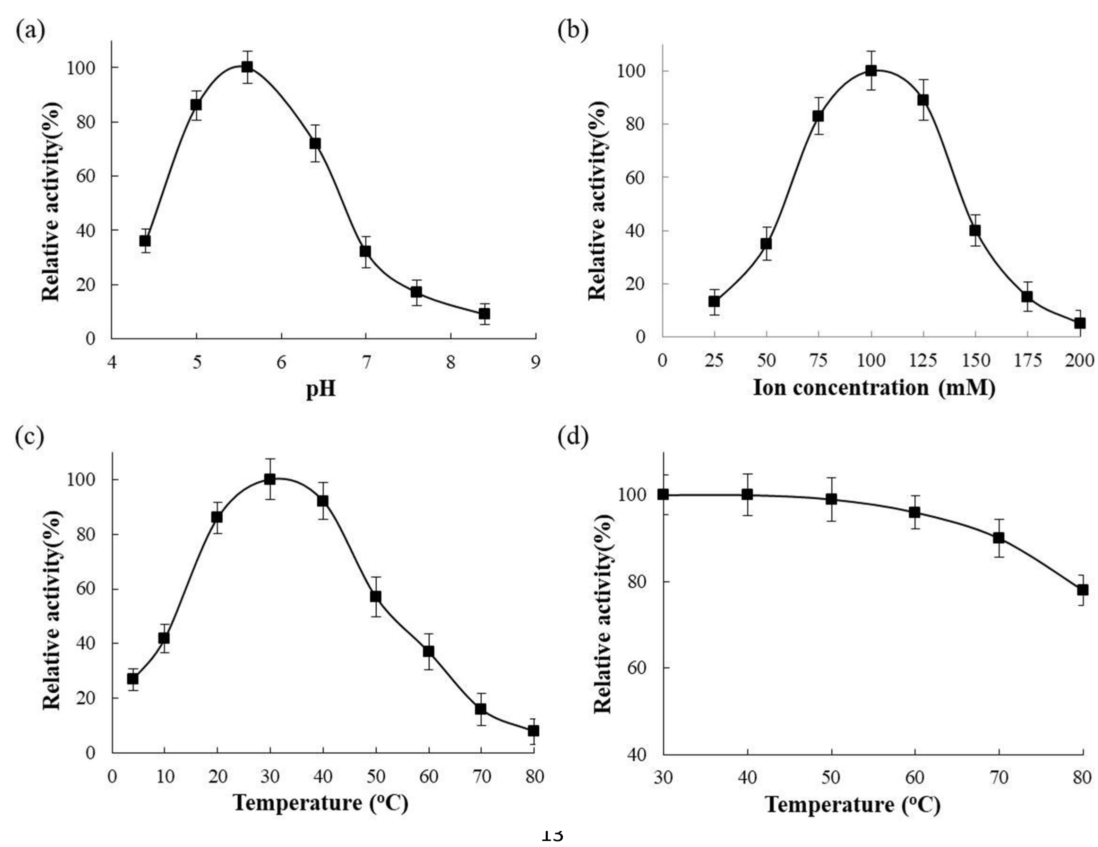


图 9　pH、离子浓度和温度对 rhLysG2 活性和稳定性的影响

Fig. 9　Effect of pH, ion concentration and temperature on rhLysG2 activity and stability.

(a) Activities of rhLysG2 at different pH; (b) Effect of ion concentration on rhLysG2 activity; (c) Effect of temperature on rhLysG2 activity; (d) Effect of temperature on the stability of rhLysG2. All values were normalized to the peak activity for each curve (100%).

表 3　金属离子对 rhLysG2 活性的影响

Table 3　Effect of metal ions on rhLysG2 activity

Ion	Na^{+}	Co^{+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{3+}
Relative activity(%)	100	31.4	68.5	56.8	0	83.0	78.2	42.3

2.7　杀菌活性分析

在所测的 2 株 Gram 阳性细菌中，rhLysG2 对金黄色葡萄球菌有明显的杀菌作用，但对粪肠球菌的杀菌活性不显著；rhLysG2 对沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、无乳链球菌 3 株 Gram 阴性菌都有明显杀菌作用，但其强弱存在菌间差异；其中，对多杀性巴氏杆菌和无乳链球菌的杀菌作用最强，对沙门氏菌也有明显的杀菌作用（图 10）。

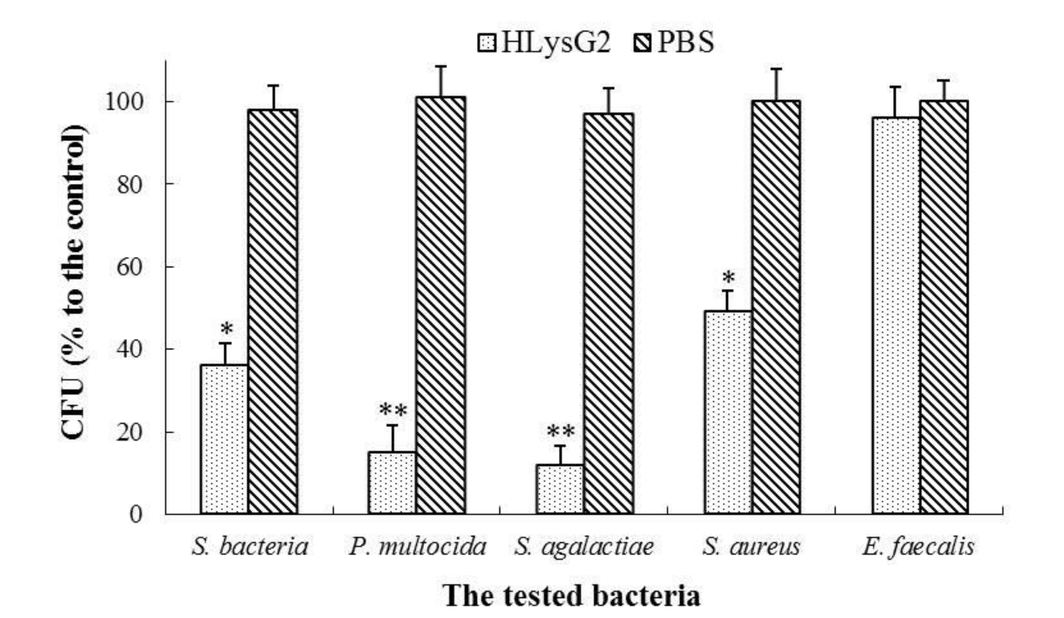


图 10　rhLysG2 杀菌活性分析(n=3)

Fig. 10　Bactericidal activity analysis of rhLysG2

** $P < 0.01$ vs the control group; * $P < 0.05$ vs the control group

3　讨论

此前，本课题组已对hLysG2的组织表达谱进行了初步分析，与C型溶菌酶在人体内广泛存在于各种组织、器官和体液中不同，hLysG2在人体内的分布十分局限，仅在眼部和男性生殖道这两个十分重要的器官系统中有分布[12, 14-15]。在眼部，泪腺和副泪腺可向泪液中分泌高浓度的C型溶菌酶，但睾丸组织并不表达C型溶菌酶[28, 29]。这种分布上的差异提示hLysG2与C型溶菌酶的作用并不完全相同；在酶学性质上，hLysG2可在高渗环境下发挥杀菌活性，可以弥补人C型溶菌酶作用的不足[12]；另外，hLysG2与抗生素发挥杀菌作用的机制也不相同，这些特点使得hLysG2具有成为新型抗耐药菌药物的潜力。

对于抗菌蛋白药物开发而言，如何对其进行高水平重组表达是促进其应用研究的第一个重要前提。目前已有的G型溶菌酶相关报道大都使用大肠杆菌制备重组蛋白[5, 8]，但目的蛋白在大肠杆菌中以包涵体的形式被表达，蛋白回收需要进行细胞裂解、蛋白复性等后续处理过程，使得蛋白制备成本很高，不适宜进行规模生产。本研究此前利用*AOX1*启动子在毕赤酵母中表达了具有良好酶学活性的rhLysG2[12, 29]。由于*AOX1*启动子的表达系统需要使用危险性高的甲醇作为碳源，生产过程中需要进行碳源转换导致发酵时间较长，并且在药用蛋白的生产过程中存在产品中甲醇残余的问题，这些问题都导致了生产成本的增加。因此，为了继续优化rhLysG2的生产工艺，本研究利用GAP启动子在毕赤酵母中组成型表达rhLysG2。结果表明，与诱导型表达系统相比，利用GAP启动子在毕赤酵母中组成型表达rhLysG2的发酵时间缩短了48 h，发酵液上清中rhLysG2总活性提高了23.8%，因此在小规模发酵水平证实这一系统适合用于表达rhLysG2。

对于重组蛋白质的研究利用而言，能否进行低成本、高得率的纯化是关键环节。已有研究往往向G型溶菌酶蛋白序列中添加组氨酸标签（His-tag）、麦芽糖结合蛋白（MBP）、谷胱甘肽S转移酶（GST）等各种亲和纯化标签，以便于获取目的蛋白，如有研究者在使用大肠杆菌分别表达海马G型溶菌酶和红点石斑鱼G型溶菌酶时，均在目的蛋白序列中引入MBP标签后对重组蛋白进行亲和纯化[5, 8]。本研究利用甲壳素亲和介质对发酵液上清中的rhLysG2进行亲和纯化，使用这一方法不需要向蛋白中引入任何亲和纯化标签，从而保持了rhLysG2的天然结构。经过甲壳素亲和层析和分子筛层析两步即可实现对目的蛋白的高效纯化，蛋白纯度>99.0%，上清液酶活性回收率可达到42.74%[29]。

总的来看，本研究利用 GAP 启动子在毕赤酵母中组成型表达了 rhLysG2，并通过使用甲壳素亲和层析在小试规模建立一套有效的 rhLysG2 生产工艺流程，纯化到的 rhLysG 具较高的酶学活性和对多种致病菌的杀菌活性。本研究首次对于 G 型溶菌酶的表达条件进行了优化，是对 rhLysG2 应用研究的有益探索，将为新型抗耐药菌药物的开发奠定基础。

参考文献

[1] Irwin D M. Evolution of the vertebrate goose-type lysozyme gene family. BMC Evolutionary Biology, 2014, 14: 188–202.

[2] Weaver L H, Grutter M G, Remington S J, et al. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. Journal of Molecular Evolution, 1985, 21(2): 97–111.

[3] Prager E M. Adaptive evolution of lysozyme: changes in amino acid sequence, regulation of expression and gene number. EXS, 1996, 75:323–345.

[4] Canfield R E, McMurry S. Purification and characterization of a lysozyme from goose egg

white. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967, 26(1): 38–42.

[5] Ko J, Wan Q, Bathige S D, et al. Molecular characterization, transcriptional profiling, and antibacterial potential of G-type lysozyme from seahorse (*Hippocampus abdominalis*). Fish & Shellfish Immunology, 2016, 58, 622–630.

[6] Liu Q N, Xin Z Z, Zhang D Z, et al. Molecular identification and expression analysis of a goose-type lysozyme (LysG) gene in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 58, 423–428.

[7] Gao C, Fu Q, Zhou S, et al. The mucosal expression signatures of g-type lysozyme in turbot (*Scophthalmus maximus*) following bacterial challenge. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 612–619.

[8] Wei S, Huang Y, Huang X, et al. Molecular cloning and characterization of a new G-type lysozyme gene (Ec-lysG) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Developmental and Comparative Immunology, 2014, 46(2): 401–412.

[9] Buonocore F, Randelli E, Trisolino P, et al. Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass *(Dicentrarchus labrax L.*). Molecular Immunology, 2014, 62(1): 10–18.

[10] Wang R, Feng J, Li C, et al. Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(1): 136–145.

[11] Guo Y, He H. Identification and characterization of a goose-type lysozyme from sewage snail *Physa acuta*. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2):321–325.

[12] Huang P, Li W S, Xie J, et al. Characterization and expression of hLysG2, a basic goose-

type lysozyme from the human eye and testis. Molecular Immunology, 2011, 48(4): 524–531.

[13] Irwin D M, Gong Z. Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes. Journal of Molecular Evolution, 2003, 56(2): 234–242.

[14] 黄鹏，杨智昉，谢君等．人g2型溶菌酶的多克隆抗体制备及其在睾丸中的表达分析．免疫学杂志, 2016, 32 (10): 842–847.

Huang P, Yang Z F, Xie J, et al. Preparation of polyclonal antibody of human goose-type lysozyme 2 and its expression in human testis. Immunology Journal, 2016, 32 (10): 842–847.

[15] 黄鹏，杨智昉，鲍建瑛等．人精浆中g2型溶菌酶的纯化及其酶学活性分析．细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(3): 320–325.

Huang P, Yang Z F, Bao J Y, et al. Purification of human goose-type lysozyme 2 (hLysG2) from human seminal plasma and analysis of its enzymatic properties. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2017, 33(3): 320–325.

[16] Stahlmann R. Antibiotics for treatment of infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Pneumologie, 2014, 68(10): 676–84.

[17] Holmes N E, Howden B P. What's new in the treatment of serious MRSA infection? Current Opinion in Infectious Diseases, 2014, 27(6): 471–478.

[18] Daly R, Hearn M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. Journal of Molecular Recognition, 2005, 18(2), 119–138.

[19] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 2005, 22(4), 249–270.

[20] Jahic M, Veide A, Charoenrat T, et al. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress, 2006, 22(6), 1465–1473.

[21] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5301–5317.

[22] Romanose M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast, 1992, 8(6): 423–488.

[23] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene, 1997, 186(1): 37–44.

[24] Zhang A L, Luo J X, Zhang T Y, et al. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(6): 552–557.

[25] Menéndez C, Martínez D, Trujillo L E, et al. Constitutive high-level expression of a codon-optimized β-fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(3): 1201–1212.

[26] 钱凯, 张晶晶, 吴素平等. 利用GAP 启动子在毕赤酵母中表达与纯化GLP-1类似物. 中国生物工程杂志, 2015, 35 (5): 66–73.

Qian K, Zhang J J, Wu S P, et al. Constituted expression and purification of glucagon-like peptide-1 analogue in *Pichia pastoris* using GAP promoter, China Biotechnology, 2015, 35(5): 66–73.

[27] 黄鹏, 李文姝, 谢君等. 甲壳素亲和层析在人g2型溶菌酶制备中的应用. 免疫学杂志, 2015, 31(5): 430–435.

Huang P, Li W SH, Xie J, et al. Application of chitin affinity chromatography in purification of recombinant hLysG2. Immunology Journal, 2015, 31(5): 430–435.

[28] Klockars M, Reitamo S. Tissue distribution of lysozyme in man. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1975, 23(12): 932–940.

[29] Mason D Y, Taylor C R. The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. Journal of Clinical Pathology, 1975, 28(2): 124–132.